

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE**  
**UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ANA PAULA AGUIAR MILANEZ**

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE ÁCIDO ETILMALÔNICO**  
**SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÓRTEX**  
**CEREBRAL E MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS JOVENS**

**CRICIÚMA, ABRIL DE 2013.**

**ANA PAULA AGUIAR MILANEZ**

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE ÁCIDO ETILMALÔNICO  
SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÓRTEX  
CEREBRAL E MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS JOVENS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em Ciências da  
Saúde da Universidade do Extremo Sul  
Catarinense para exame de qualificação.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Fernanda Schuck  
Co-orientador: Prof. Dr. Gustavo da Costa Ferreira

**CRICIÚMA, ABRIL DE 2013.**

### **Folha Informativa**

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, na Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

*“Dedico este trabalho aos meus pais,  
Nelson (in memoriam) e Vera, ao meu  
companheiro Sandro, à minha filha Ana  
Clara e aos portadores de Erros Inatos  
do Metabolismo, em especial àqueles  
com SCADD.”*

## **AGRADECIMENTOS**

*“Agradeço em primeiro lugar a Deus, a quem recorro nas horas de angustias; nunca me abandonou, e ainda me concede o prazer de viver com saúde.*

*Aos meus pais, fortes incentivadores e principais responsáveis pela educação e formação que tenho hoje. Meu muito Obrigada!!!*

*Ao meu companheiro e eterno amor Sandro, por todos os momentos egoístas que tive durante esses meses, tendo ele que muitas vezes ser pai e mãe de nossa filha. Ainda assim, sempre esteve ao meu lado, apostando em minha grande vontade de estudar.*

*Agradeço de forma muito sincera à minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patrícia Fernanda Schuck, pela paciência, pela sabedoria e pelo carinho que teve por mim desde o primeiro momento. Forte responsável pela “maturidade científica” a qual adquiri. Estendo esse agradecimento ao co-orientador Prof. Dr. Gustavo da Costa Ferreira.*

*A todos os Professores Doutores do PPGCS, a todos(as) do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, em especial à mestranda Tamires Pavei Macan.*

*À Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, por oportunizar a aquisição deste título.”*

*“ A maior sabedoria é conhecer-se a si mesmo.”*

*Galileu Galilei*

## RESUMO

O ácido etilmalônico (EMA) se acumula em tecidos e fluidos biológicos de pacientes afetados pela deficiência da desidrogenase de acil-coenzima A de cadeia curta (SCADD) e pela encefalopatia etilmalônica (EE). Ambas as doenças caracterizam-se por sintomas neurológicos e musculares. O presente trabalho investigou os efeitos da administração aguda de EMA sobre parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral e músculo esquelético de ratos de 30 dias de vida. Os animais receberam três injeções subcutâneas de EMA (6  $\mu$ mol/g; 90 minutos de intervalo entre as injeções) e foram eutanasiados 1 hora após a última injeção. Os animais do grupo controle receberam solução salina nos mesmos volumes. A administração de EMA aumentou significativamente os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e o conteúdo de grupamentos carbonila em córtex cerebral e músculo esquelético, quando comparados ao grupo controle. A administração aguda de EMA também aumentou significativamente a oxidação de 2',7'-diclorofluoresceína reduzida e a geração de ânion superóxido. Por outro lado, a atividade da enzima glutathione peroxidase em córtex cerebral foi inibida pela administração de EMA, em comparação ao grupo controle. Adicionalmente, os níveis de glutathione reduzidas encontraram-se diminuídos no músculo esquelético dos animais que receberam a administração aguda de EMA. Os resultados do presente estudo mostram que a administração aguda de EMA induz estresse oxidativo em córtex cerebral e músculo esquelético de ratos jovens, sugerindo que o dano oxidativo possa estar envolvido na fisiopatologia dos danos neurológicos e musculares encontradas em pacientes afetados por SCADD e EE.

Palavras-chave: ácido etilmalônico; deficiência de SCAD; encefalopatia etilmalônica; estresse oxidativo.

## ABSTRACT

Ethylmalonic acid (EMA) accumulates in tissues and biological fluids of patients affected by short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (SCADD) and ethylmalonic encephalopathy, illnesses characterized by neurological and muscular symptoms. Considering that the mechanisms responsible for the brain and skeletal muscle damage in these diseases are poorly known, in the present work we investigated the effects of acute EMA administration on oxidative stress parameters in cerebral cortex and skeletal muscle from 30-day-old rats. Animals received three subcutaneous injections of EMA (6  $\mu\text{mol/g}$ ; 90 min interval between injections) and were killed 1 h after the last injection. Control animals received saline in the same volumes. EMA administration significantly increased thiobarbituric acid-reactive substances levels in cerebral cortex and skeletal muscle, indicating an increased lipid peroxidation. In addition, carbonyl content was increased in EMA-treated animal skeletal muscle when compared to the saline group. EMA administration also significantly increased DCFH oxidation and superoxide production (reactive species markers), and decreased glutathione peroxidase activity in cerebral cortex, while glutathione levels were decreased in skeletal muscle. The present results show that acute EMA administration elicits oxidative stress in rat brain and skeletal muscle, suggesting that oxidative damage may be involved in the pathophysiology of the brain and muscle symptoms found in patients affected by SCADD and ethylmalonic encephalopathy.

**Keywords:** Ethylmalonic acid; SCAD deficiency; ethylmalonic encephalopathy; oxidative stress.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Visão geral da integração entre a degradação de ácidos graxos com o Ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa para a formação de ATP .....	15
<b>Figura 2.</b> Ilustração das 4 etapas da beta-oxidação dos ácidos graxos. A acil-CoA formada após cada volta tem dois carbonos a menos e reinicia o ciclo. Os produtos finais da via são acetil-CoA, FADH <sub>2</sub> e NADH.....	16
<b>Figura 3.</b> Formação dos metabólitos na SCADD a partir de triglicerídeos.....	18
<b>Figura 4.</b> Reação catalisada pela enzima SOD.....	25
<b>Figura 5.</b> Reações bioquímicas catalisadas pela CAT e GPx.....	26
<b>Figura 6.</b> Modelo animal de acidemia etilmalônica.....	32
<b>Figura 7.</b> Efeitos da administração aguda de ácido etilmalônico (EMA) sobre os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral e músculo esquelético de ratos jovens. Os valores representam a média ± erro padrão da média e estão expressos em nmol . mg proteína <sup>-1</sup> . *** <i>p</i> < 0,001 em comparação ao grupo controle.....	38
<b>Figura 8.</b> Efeitos da administração aguda de ácido etilmalônico (EMA) sobre os conteúdos de grupamentos carbonila (A) e sulfidril (B) em córtex cerebral e músculo esquelético de ratos jovens. Os valores representam a média ± erro padrão da média e estão expressos em nmol . mg proteína <sup>-1</sup> . *** <i>p</i> < 0,001 em comparação ao grupo controle (Teste <i>t</i> de Student para amostras independentes).....	39
<b>Figura 9.</b> Efeitos da administração aguda de ácido etilmalônico (EMA) sobre a oxidação de 2',7,-diclorofluoresceína reduzida (A) e produção de ânion superóxido (B) em córtex cerebral e músculo esquelético de ratos jovens. Os valores representam a média ± erro padrão da média e estão expressos em nmol . mg	

proteína<sup>-1</sup>(DCFH) e nM .min<sup>-1</sup>. mg proteína<sup>-1</sup> (superóxido). \**p*< 0,05 em comparação ao grupo controle (Teste *t* de Student para amostras independentes).....40

**Figura 10.** Efeitos da administração aguda de ácido etilmalônico (EMA) sobre as atividades das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase (GPx) (A), catalase (B) e superóxido dismutase (C) e sobre as concentrações de glutathione reduzida (GSH) (D) em córtex cerebral e músculo esquelético de ratos jovens. ....41

## LISTA DE ABREVIATURAS E ABREVIações

ACAD – Desidrogenases de acil-CoA (do inglês *acyl-CoA dehydrogenases*)

ACETIL-CoA – Acetil-coenzima A

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AE – Acidemia/Acidúria etilmalônica

ARNm - Ácido ribonucleico mensageiro

ATP – Trifosfato de adenosina (do inglês *adenosine triphosphate*)

CAT – Catalase

CK – Creatina cinase (do inglês *creatine kinase*)

DCFH – 2',7'-diclorofluoresceína, forma reduzida

EC – Comissão de enzimas (do inglês *enzyme commission*)

EE – Encefalopatia etilmalônica

EIM – Erros inatos do metabolismo

EMA – Ácido etilmalônico (do inglês *ethylmalonic acid*)

EO – Estresse oxidativo

ERN – Espécies reativas de nitrogênio

ERO – Espécies reativas de oxigênio

ETF – Flavoproteína transferidora de elétrons (do inglês *electron-transfer flavoprotein*)

FAD – Dinucleotídeo de flavina e adenina (do inglês *flavine adenine dinucleotide*)

FADH<sub>2</sub> - Dinucleotídeo de flavina e adenina, forma reduzida (do inglês *flavine adenine dinucleotide*)

GPx – Glutathione peroxidase

GSH – Glutathione reduzida

GSSH – Glutathiona oxidada

LCHAD – Desidrogenase de 3-hidroxiacil-CoA de cadeia longa (do inglês *long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase*)

LPO – Lipoperoxidação

MCAD – Desidrogenase de acil-CoA de cadeia média (do inglês *medium-chain acyl-CoA dehydrogenase*)

MCADD – Deficiência de desidrogenase de acil-CoA de cadeia média (do inglês *medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency*)

MSA – Ácido metilsuccínico (do inglês *methylsuccinic acid*)

NAD<sup>+</sup> - Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma oxidada (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide*)

NADH - Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma reduzida (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide*)

NAK – Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase

NO – óxido nítrico (do inglês *nitric oxide*)

OMIM – Base de dados de doenças de herança mendeliana em humanos (do inglês *Online Mendelian Inheritance in Man*)

SCAD – Desidrogenase de acil-CoA de cadeia média (do inglês *short-chain acyl-CoA dehydrogenase*)

SCADD - Deficiência de desidrogenase de acil-CoA de cadeia curta (do inglês *short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency*)

SCHAD – Desidrogenase de 3-hidroxiacil-CoA de cadeia curta (do inglês *3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase*)

SNC – Sistema nervoso central

SOD – Superóxido dismutase

TBA-RS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês *thiobarbituric acid-reactive species*)

VLCAD – Desidrogenase de acil-CoA de cadeia muito longa (do inglês *very long-chain acyl-CoA dehydrogenase*)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	15
<b>1.1 Deficiência da desidrogenase de acil-CoA de cadeia curta</b>	15
1.1.1 Beta-oxidação dos ácidos graxos	15
1.1.2 Defeitos na beta-oxidação de ácidos graxos	16
1.1.3 Deficiência da desidrogenase de acil-CoA de cadeia curta	17
1.1.4 Achados bioquímicos e laboratoriais da SCADD	19
1.1.5 Diagnóstico e tratamento	20
1.1.6 Fisiopatologia na SCADD	21
<b>1.2 Encefalopatia etilmalônica</b>	22
1.2.1 Definição, sinais e sintomas	22
1.2.2 Diagnóstico e tratamento	23
<b>1.3 EMA na fisiopatologia da EE e SCADD</b>	24
<b>1.4 O estresse oxidativo e EMA</b>	25
1.4.1 Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio	25
1.4.2 O estresse oxidativo na SCADD	28
<b>2. OBJETIVOS</b>	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos	30
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	31
3.1 Animais	31
3.2 Modelo animal de acidemia etilmalônica induzido quimicamente	31
3.3 Preparo da amostra	32

<b>3.4 Análises bioquímicas</b>	<b>32</b>
3.4.1 Medida dos níveis de TBA-RS	33
3.4.2 Medida da oxidação de DCFH	33
3.4.3 Medida da produção de ânions superóxido	34
3.4.4 Medida de sulfidrilas totais	34
3.4.5 Medida de grupamentos carbonilas	34
3.4.6 Determinação das concentrações de GSH	35
3.4.7 Medida das atividades das enzimas antioxidantes	35
3.4.8 Dosagem de proteínas	36
<b>3.5 Análise estatística</b>	<b>36</b>
<b>3.6 Biossegurança</b>	<b>37</b>
<b>3.7 Destino dos animais pós-experimentação</b>	<b>37</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>38</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>43</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>48</b>
<b>7. ANEXOS</b>	<b>60</b>
7.1 Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais	61

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Deficiência da desidrogenase de acil-coenzima A de cadeia curta (SCADD)

#### 1.1.1 Beta-oxidação de ácidos graxos

Os ácidos graxos sustentam o metabolismo energético principalmente durante o período de jejum através do processo chamado beta-oxidação. Este processo gera acetil-coenzima A (acetil-CoA) e libera energia para a síntese de trifosfato de adenosina (ATP) na matriz mitocondrial para diversos tecidos corporais (Roe e Ding, 2001). Com exceção das hemácias (que não possuem mitocôndria) e do tecido cerebral, todos os demais tecidos corporais dependem da beta-oxidação para garantir aporte energético durante o jejum (Nelson e Cox, 2011). A cadeia carboxílica dos ácidos graxos fornece substratos a importantes vias metabólicas para transformação de energia como ao ciclo de Krebs e à fosforilação oxidativa (Nelson e Cox, 2011), conforme observamos na Figura 1.

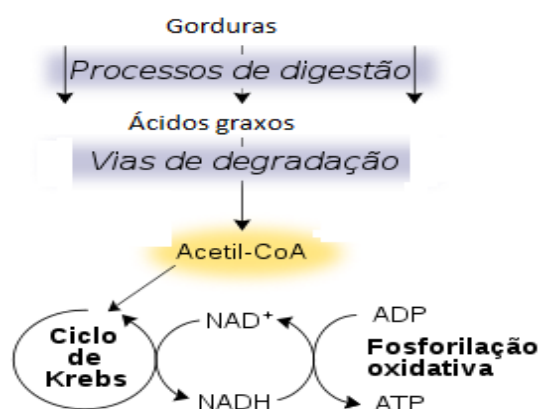


Figura 1: Visão geral da integração entre a degradação de ácidos graxos com o Ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa para a formação de ATP (Adaptado de Nelson e Cox, 2011).



A oxidação dos ácidos graxos é composta de várias etapas: primeiramente ocorre a captação celular de ácidos graxos; em seguida, a ativação desses mesmos ácidos graxos a ésteres acil-CoA; depois, transesterificação a acilcarnitinas; translocação através da membrana mitocondrial; re-esterificação a acil-CoA e entrada na espiral da beta-oxidação intramitocondrial (Figura 2), que libera acetil-CoA e fornece elétrons para flavoproteínas transferidoras de elétrons (ETF) e para o dinucleotídeo de nicotinamida e adenina ( $\text{NAD}^+$ ). Cada etapa da espiral de oxidação é catalisada por enzimas específicas para o comprimento da cadeia carbônica do ácido graxo (Smith et al., 2005).

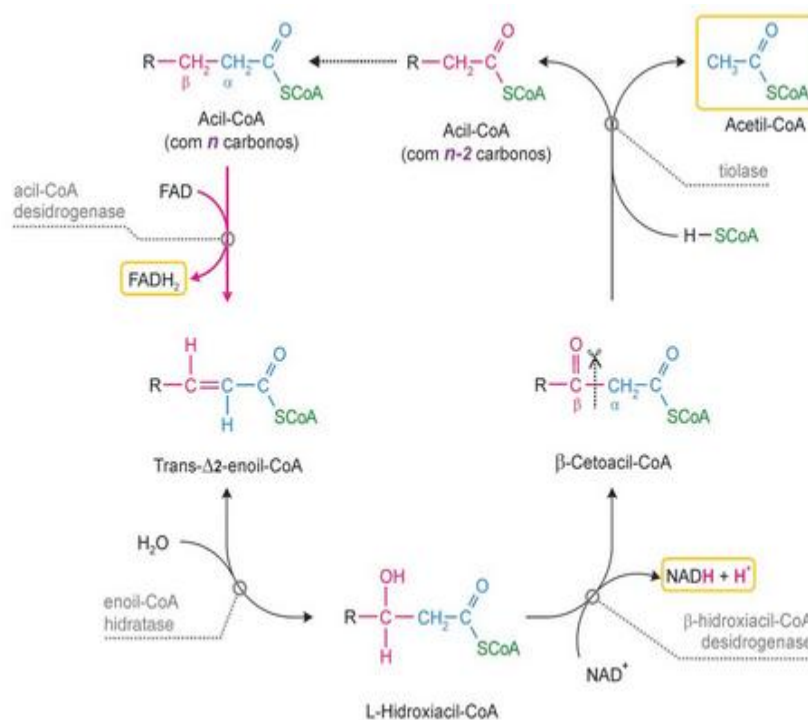


Figura 2: Ilustração das 4 etapas da beta-oxidação dos ácidos graxos. A acil-CoA formada após cada volta tem dois carbonos a menos e reinicia o ciclo. Os produtos finais da via são acetil-CoA,  $\text{FADH}_2$  e  $\text{NADH}$ . (Fonte: Smith et al., 2005)

### 1.1.2 Defeitos da beta-oxidação de ácidos graxos

Defeitos detectados na beta-oxidação foram descritos inicialmente na década de 1970, quando pacientes apresentaram fraqueza muscular ou rabdomiólise após o exercício físico e apontou-se que esses sintomas estavam relacionados à deficiência de carnitina (Kolvraa et al., 1982). Em 1980, foi descrita a deficiência da desidrogenase de acil-CoA de cadeia média (MCADD) e, desde então, pelo menos 23 diferentes doenças afetando essa rota metabólica foram descritas, incluindo defeitos no transporte de carnitina na membrana plasmática, nas enzimas carnitina palmitoiltransferase I e II, carnitina/acilcarnitina translocase, nas desidrogenases de acil-CoA de cadeia muito longa (VLCAD), média (MCAD) e curta (SCAD), 2,4-dienoil-CoA redutase e nas desidrogenases de 3-hidroxi-acil-CoA de cadeia longa (LCHAD) e curta (SCHAD), bem como na proteína trifuncional mitocondrial (Rinaldo et al., 2001; Roe e Ding, 2001).

### *1.1.3 Deficiência da desidrogenase de acil-CoA de cadeia curta*

A deficiência da desidrogenase de acil-CoA de cadeia curta (SCADD; OMIM # 201470) é um erro inato do metabolismo (EIM) de herança autossômica recessiva, cujo defeito está localizado nos últimos ciclos da beta-oxidação mitocondrial de ácidos graxos, sendo a SCAD (EC 1.3.99.2) específica para ácidos graxos de cadeia curta (4 a 6 carbonos) (Bhala et al., 1995). A deficiência neste passo leva ao acúmulo dos ácidos graxos de cadeia curta etilmalônico (EMA) e metilsuccínico (MSA) nos tecidos e líquidos biológicos dos pacientes afetados por SCADD. Tais ácidos orgânicos são originados pela carboxilação do butiril-CoA inadequadamente acumulado, conforme demonstrado na figura 3 (Roe e Ding,

2001). Além desses metabólitos, butirilcarnitina e butirilglicina também se acumulam nos tecidos e líquidos biológicos dos pacientes (Tein et al., 1999; Roe e Ding, 2001).

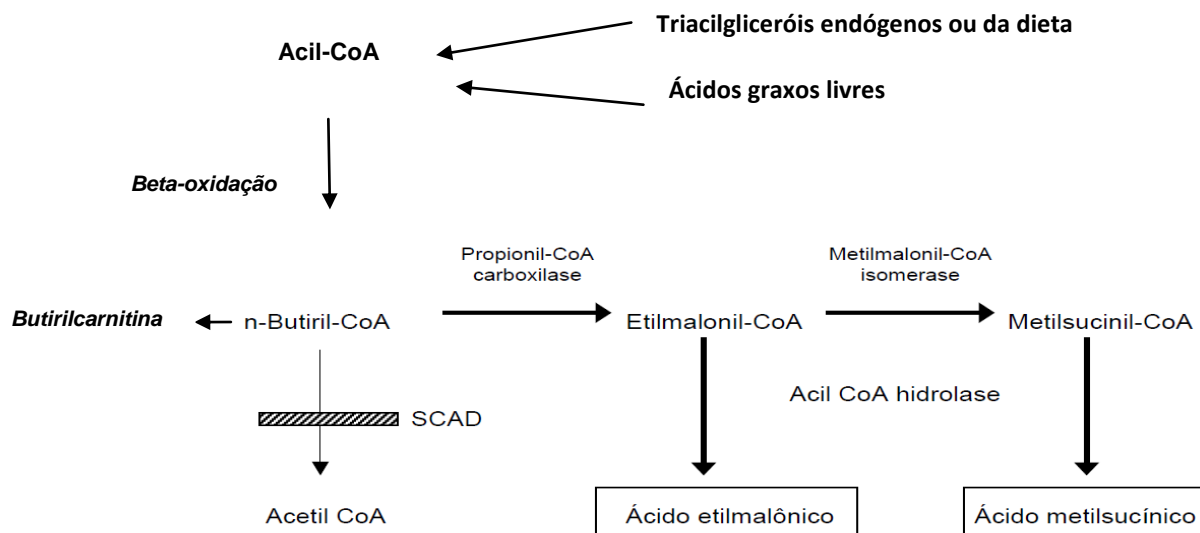


Figura 3: Formação dos metabólitos na SCADD a partir de triacilgliceróis (adaptado de Swell, 1993).

A SCAD pertence à família das desidrogenases de acil-CoA (ACADs), que possuem papel importante na beta-oxidação, pois estas enzimas catalisam a transferência dos elétrons dos ésteres de acil-CoA para as coenzimas  $\text{NAD}^+$  e FAD ao longo da espiral (Hoppel et al., 1979; Nagao et al., 1992). Em humanos, encontramos as ACADs de cadeia muito longa, longa, média e curta (VLCAD, LCAD, MCAD e SCAD, respectivamente), cujos substratos variam conforme o número de carbonos da cadeia (18, 12, 8 e 4 carbonos, respectivamente) (Bhala et al., 1995; Roe e Ding, 2001; Jethva et al., 2008).

A SCADD foi reportada pela primeira vez em 1987 (Amendt et al., 1987) e parece estar associada a um amplo espectro de sinais e sintomas, conforme estudo de coorte publicado por Corydon (2001), dos quais podemos citar atraso no

desenvolvimento, hipotonia, epilepsia e hipoglicemia não-cetótica. Em alguns casos isolados, pacientes apresentaram vômitos, disfunção hepática e atrofia óptica bilateral.

Com relação ao binômio genótipo e fenótipo, na SCADD, ocorre uma alta probabilidade de polimorfismos e de mutações genéticas. Van Maldegem e colaboradores (2010) relatam que já foram publicadas mais de 70 mutações e/ou polimorfismo das ACADs, sendo muitos indivíduos assintomáticos. O fenótipo está relacionado à mutação genética envolvida, que pode se apresentar desde uma deficiência na biogênese da enzima até sua completa inativação (Pedersen et al., 2003). Os sinais clínicos, na maioria dos pacientes, aparecem por volta dos 5 anos de idade (Pedersen et al., 2008; Waisbren et al., 2008).

A frequência da SCADD é desconhecida e pode ser subestimada, visto a grande variedade de sintomas e a dificuldade de confirmação do diagnóstico precoce. Porém, resultados de triagens neonatais sugerem que seja de 1:33.000, usando como ponto de corte 1,0  $\mu$ M de butirilcarnitina no sangue, ou 1:340.000 sem avaliação de ponto de corte (Waisbren et al., 2008). Jethva e colaboradores (2008) postularam que, na Holanda, a prevalência parece estar estimada em 1:50.000, utilizando critérios bioquímicos e moleculares, isto é, a presença de butirilcarnitina e EMA nos fluidos corporais.

#### *1.1.4 Achados bioquímicos e laboratoriais da SCADD*

Bioquimicamente, todos os pacientes afetados demonstraram elevada excreção de EMA e, em menores concentrações, de MSA em seus tecidos e líquidos biológicos (Roe e Ding, 2001; Jethva et al., 2008). Desta maneira, postula-

se que as acidemias etilmalônica (EA) e metilsuccínica sejam a marca bioquímica do fenótipo da SCADD (Gregersen et al., 1998).

É possível observar que a concentração de acilcarnitinas e acilglicinas, como butirilcarnitina e isovalerilglicina, respectivamente, também está aumentada tanto no plasma como na urina destes pacientes, pois são os subprodutos advindos da carboxilação do butiril-CoA (Bhala et al., 1995; Dawson et al., 1995; Tein et al., 1999).

As análises bioquímicas são muito particulares na SCADD, pois muitos pacientes não apresentam a forma clássica que caracteriza as doenças relacionadas à beta-oxidação, como hipoglicemia hipocetótica e rabdomiólise recorrente. Isso sugere que a via de oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa e média sustentam a demanda de energia, até esta via ser interrompida pelo defeito enzimático (Birkebaek et al., 2002). Alguns pacientes podem sofrer de acidose láctica (Garcia-Silva, 1994; Ozand et al., 1994) e alterações mitocondriais, podendo ter o paciente um falso diagnóstico de acidose láctica primária.

#### *1.1.5 Diagnóstico e tratamento*

A análise da urina por cromatografia gasosa e espectrometria de massa dos níveis de EMA e MSA é utilizada como diagnóstico da SCADD. Este diagnóstico deve ser confirmado pela análise de ácido desoxirribonucleico (ADN), mostrando a mutação gênica e/ou variantes para a SCADD ou a sua atividade. Aproximadamente 6% da população parecem apresentar essa mutação gênica, podendo ou não desenvolver as manifestações clínicas (Van Maldegem et al., 2010).

Quanto a seu tratamento, ainda não há um consenso formado entre a comunidade científica. No entanto, o seu manejo deve ser similar aos demais distúrbios relacionados à beta-oxidação dos ácidos graxos, com o foco voltado a evitar episódios de jejum. O indivíduo não deve permanecer mais de 4 a 6 horas sem alimentação, além de ter uma dieta com restrição de lipídeos. Em muitos casos, crianças pequenas devem ser alimentadas durante a noite. Durante crises agudas, normalmente desencadeadas por jejum, exercícios físicos ou infecções, deve ser administrado fluido com alto teor de dextrose ( $8-10\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) por via intravenosa, para reverter o estado catabólico (Jethva et al., 2008).

#### *1.1.6 Fisiopatologia da SCADD*

Os mecanismos fisiopatológicos envolvendo a SCADD ainda não estão definidos. Conforme estudo publicado por Pedersen e colaboradores (2008) com 114 pacientes afetados, foi observado que 69% deles apresentavam como principal sintoma o atraso no desenvolvimento. Pacientes afetados pela SCADD também apresentavam acidose metabólica aguda, vômitos, doenças musculares progressivas, microcefalia, atraso no desenvolvimento e deficiência intelectual (Bhala et al., 1995). Os sinais e sintomas estão associados a um grande espectro de dano tecidual, os mais comuns apresentados pelos pacientes afetados envolvem músculo esquelético, músculo cardíaco e sistema nervoso central e parecem estar relacionados ao acúmulo de ácidos orgânicos de cadeia curta e sua toxicidade aos tecidos (Bhala et al., 1995; Dawson et al., 1995; Pedersen et al., 2008; Tein et al., 2008). A SCADD se diferencia dos demais distúrbios da beta-oxidação pela ausência aparente de hipoglicemia e por ser mais agressiva ao sistema nervoso

central (SNC). É possível que a cetogênese e a gliconeogênese estejam estimuladas pela oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa e média (Bhala et al., 1995; Tein et al., 1999).

## **1.2 Encefalopatia Etilmalônica**

### **1.2.1 Definição, Sinais e Sintomas**

A excreção aumentada de EMA não é uma exclusividade da SCADD. Burlina (1994) descreveu pacientes que apresentavam acidemia/acidúria etilmalônica (AE) acompanhada de aumento de acilglicinas e acilcarnitinas de cadeia curta e ramificada, porém com atividade normal da SCAD e demais enzimas da beta-oxidação. A esse distúrbio chamou-se de síndrome da encefalopatia etilmalônica (EE; OMIM # 602473) (Ozand et al., 1994; Roe e Ding, 2001). Contudo, a AE é também observada em outras disfunções orgânicas, como acidúria glutárica tipo 2 (OMIM # 231680). A EE é um EIM causado por uma mutação no gene ETHE1 e, apesar de rara, geralmente tem consequências devastadoras aos pacientes acometidos (Tiranti et al., 2004). Esta mutação genética resulta em um defeito no catabolismo intramitocondrial do sulfeto, que envolve a enzima sulfeto dioxigenase (EC 1.13.11.18), provocando um acúmulo deste em níveis tóxicos (Tiranti et al., 2006).

EE é caracterizada clinicamente por regressão psicomotora e hipotonia generalizada, depois evoluindo para tetraparesia espástica, distonia, e, eventualmente, falha neurológica global, devido à acentuada neurodegeneração

(Burlina et al, 1991). O curso é inexoravelmente progressiva e geralmente leva à morte dentro da primeira década de vida (Garcia-Silva et al, 1997).

A EE é tipicamente acompanhada por diarreia crônica, lesões generalizadas de pequenos vasos (petéquias), particularmente durante infecções intercorrentes e acrocianose ortostática (Tiranti et al., 2006). A incidência desta doença é ainda desconhecida. No entanto, 50 casos já foram confirmados em todo o mundo. Até agora, a maioria dos indivíduos afetados têm sido de origem árabe ou mediterrânea (Mineri et al., 2008). O curso desta doença é progressivo, podendo levar o indivíduo à morte na primeira década de vida (Garcia-Silva et al., 1997; Wash et al., 2010).

Segundo Tiranti e colaboradores (2009), o gás H<sub>2</sub>S (sulfeto de hidrogênio), o qual é acumulado na EE, inibe a ação da enzima SCAD. Com isso, apesar de nenhum problema genético ser atribuído a essa enzima, seus substratos são também acumulados e dirigidos a uma via metabólica alternativa, semelhante SCADD.

### *1.2.2 Diagnóstico e tratamento*

É possível diagnosticar de forma prévia a EE verificando-se o acúmulo patológico de EMA na urina dos pacientes. Os resultados dos testes de urina e de sangue obtidos nos pacientes com EE podem ser semelhantes aos observado na SCADD, em que a concentração urinária de EMA pode estar elevada com ou sem elevação de butirilcarnitina no soro. Por isso, é comum incluir a SCADD como alternativa de diagnóstico até que o teste diferencial da EE (genótipo) seja realizado (Merineo et al., 2006; Gregersen et al., 2008).



Pacientes com a expressão mais suave da doença foram tratados com suplemento de L-carnitina, riboflavina, coenzima Q10, assim como vitaminas, os quais parecendo contribuir para a melhora do paciente (Pigeon et al., 2009). Segundo Walsh e colaboradores (2010), o aconselhamento genético de casais que podem ser portadores da mutação genética deve ser considerado por se tratar de um distúrbio com consequências letais.

### **1.3 EMA na fisiopatologia da SCADD e da EE**

Como já foi demonstrado, o aumento da concentração de EMA ocorre tanto na EE como na SCADD. Roe e Ding (2001) descreveram que esse aumento durante episódios de catabolismo intenso, como na febre e em infecções, pode atuar sinergicamente com outros fatores, promovendo dano a estruturas nervosas do SNC dos pacientes acometidos, causando edema cerebral e até mesmo o coma.

Estudos demonstraram que o EMA *in vitro* inibe a atividade da enzima creatina cinase (CK) mitocondrial, uma importante enzima que atua na homeostasia energética, em córtex cerebral e hipocampo de ratos. Tal efeito foi prevenido pela adição de substâncias antioxidantes ao meio de incubação, sugerindo que esta inibição se deva a uma ação pró-oxidante do EMA (Schuck et al., 2002; Leipnitz et al., 2003). Barschak e colaboradores (2006) também observaram que o EMA *in vitro* inibiu a atividade de complexos da cadeia transportadora de elétrons, bem como a atividade da CK em fibroblastos de humanos.

Schuck e colaboradores (2009) demonstraram que o EMA induz déficit de aprendizado e memória, visto que ratos que receberam administração crônica de EMA no início da vida demonstraram um desempenho inferior do que os animais

controle no labirinto aquático de Morris. Recentemente, foi demonstrado que a administração de EMA induziu um aumento significativo da atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (NAK), porém diminuiu sua expressão gênica através da diminuição dos níveis de ácido ribonucleico mensageiro (ARNm) desta enzima (Schuck et al., 2013). Os dados sugerem que as alterações da NAK podem estar envolvidas na fisiopatologia do dano cerebral encontrado em pacientes com acúmulo de EMA nos fluidos corporais, como no caso da SCADD e da EE. Porém, são necessários mais estudos para o total entendimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvendo as duas doenças.

#### **1.4 O estresse oxidativo e EMA**

##### *1.4.1 Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio*

As espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) são compostos quimicamente muito instáveis e que, por sua instabilidade, ligam-se a moléculas orgânicas como lipídeos, proteínas e ADN. As ERO mais relevantes são o ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxila ( $\text{OH}^{\cdot}$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ânion hipoclorito ( $\text{OCl}^{\cdot}$ ) e o oxigênio “singlet” ( $^1\text{O}_2$ ). O óxido nítrico ( $\text{NO}^{\cdot}$ ) e o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^{\cdot}$ ) são as principais ERN (Halliwell e Gutteridge, 1999; Rimbach et al., 1999).

É na cadeia respiratória mitocondrial onde se concentra a maior produção de ERO. Cerca de 5% do oxigênio consumido não são completamente reduzidos à água, formando o ânion superóxido (Nohl et al., 1986). No entanto, através da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1), este ânion é transformado em peróxido de hidrogênio, como representado pela figura 4.

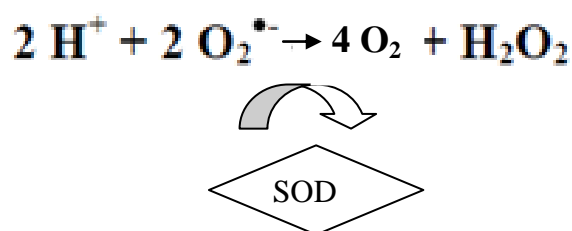


Figura 4 – Reação catalisada pela enzima SOD (Adaptado de Halliwell e Gutteridge, 2001).

Por sua vez, o peróxido de hidrogênio pode se transformar em radical hidroxila, considerado o mais instável de todas as ERO, pela reação de Fenton (Halliwell, 2003). Por isso, as enzimas que decompõem o peróxido de hidrogênio, como a catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e a glutathiona peroxidase (GPx, EC 1.11.1.9) são de extrema importância. A seguir, as reações que participam da decomposição do peróxido de hidrogênio, com a participação da SOD e da CAT:

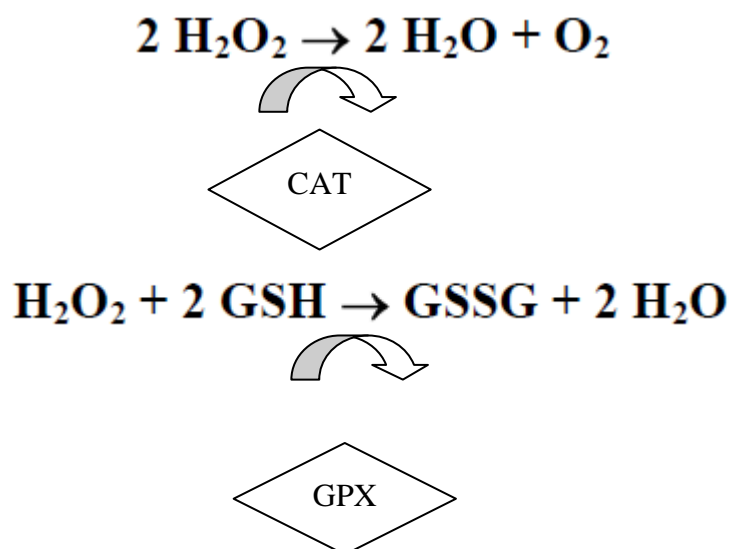


Figura 5 – Reações catalisadas pelas enzimas CAT e GPx. (Adaptado de Halliwell e Gutteridge, 2001).

Como observado na figura 5, a glutathiona reduzida (GSH) é substrato da enzima GPx. GSH é um tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina e, entre outras

funções antioxidantes, previne a oxidação dos grupos sulfidrílicos (-SH) das proteínas (Halliwell e Gutteridge, 2007).

É importante ressaltar que o metabolismo celular forma ERO fisiologicamente. Porém, as defesas antioxidantes enzimáticas (GPx, CAT, SOD, glutathione redutase) e não enzimáticas (GSH, ácido ascórbico, alfa-tocoferol, entre outras), atuam contra a ação tóxica dessas espécies e são responsáveis pelo equilíbrio entre a produção e a eliminação das mesmas (Halliwell et al., 2000). Em certas condições, pode ocorrer um aumento da produção de ERO suficiente para ultrapassar a capacidade antioxidante ou agir de forma a diminuir as defesas antioxidantes do organismo; a esse fenômeno chamamos de estresse oxidativo (EO) (Bondy e Le Bel, 1993; Cadenas e Davies, 2000). As membranas celulares e de organelas são particularmente sensíveis ao dano oxidativo devido à presença de ácidos graxos poli-insaturados em suas membranas fosfolipídicas (Weiss et al., 1986).

Esse mecanismo pode aparecer tanto em condições fisiológicas, como na fagocitose, quanto em condições patológicas, como nas doenças neurodegenerativas e na aterosclerose (Halliwell e Gutteridge, 1999). Em condições patológicas, o EO pode contribuir para a perda da função celular, devido a alterações provocadas no metabolismo da célula. Segundo Halliwell (2003), as principais alterações negativas relacionadas a esse mecanismo são a neurotoxicidade e a morte celular (Halliwell e Gutteridge, 2003).

Para o cérebro, o EO é ainda mais devastador devido a uma série de fatores. Entre eles está o fato de que o consumo de oxigênio pelo tecido é muito grande (cerca de 20% do  $O_2$  do organismo), possibilitando uma chance maior de ocasionar dano oxidativo (Halliwell et al., 1996). O elevado índice de lipídeos de membranas dos axônios, que são ricos em ácidos graxos poli-insaturados, são alvos fáceis das

ERO, estimulando a lipoperoxidação (LPO). Além disso, o cérebro possui baixos níveis de defesas antioxidantes, principalmente da enzima CAT (Halliwell et al., 1999).

Nas proteínas, as ERO's promovem a oxidação de grupamentos sulfidrila e metionila, podendo levar à desnaturação proteica. Sua oxidação é acompanhada por um aumento nos níveis de grupamentos carbonila, os quais são utilizados como marcadores de dano proteico (Cheeseman e Slater, 1993). Esse mecanismo leva à perda de aminoácidos que podem causar alterações estruturais ou enzimáticas (Tavazzi et al., 2000).

#### 1.4.2 O estresse oxidativo e SCADD

O EO é considerado um importante mecanismo fisiopatológico de distúrbios neurodegenerativos (Halliwell e Gutteridge, 2000). Estudos já realizados sugerem um papel importante do EO em modelos experimentais químicos de EIM, como hiperprolinemia tipo II (Delwing et al., 2003), hiperargininemia (Wyse et al., 2001), fenilcetonúria (Kienzle-Hagen et al., 2002) e acidemias orgânicas (Wajner et al., 2004). Em uma revisão de literatura, Wajner e colaboradores (2004) mostraram que, nos últimos anos, vários estudos *in vivo* e *in vitro* indicaram o envolvimento de EO em um grande número de acidemias orgânicas. Nas mitocondriopatias, as quais são clinicamente caracterizadas por encefalomiopatia (semelhante à SCADD), demonstrou-se que estas perturbações, particularmente devido a defeitos na cadeia respiratória, são frequentemente associadas ao aumento de ERO (Schapira et al., 2002). Estas ER podem inativar várias atividades enzimáticas com papel essencial para o metabolismo energético, conduzindo a um bloqueio adicional da respiração

celular e, conseqüentemente, a uma maior formação de ERO de forma cíclica (Heales et al., 1996).

No caso específico da SCADD, sabe-se que o acúmulo de EMA *“in vitro”* provoca uma indução de EO em córtex cerebral de ratos, aumentando a produção de espécies reativas e diminuindo as defesas antioxidantes do tecido, levando ao dano oxidativo de lipídeos e proteínas (Schuck et al., 2010).

Especula-se que o EO seja um importante mecanismo fisiopatológico que leve aos danos cerebrais e musculares observados em pacientes afetados por SCADD. Sabe-se que em pacientes afetados pela SCADD, há um aumento no dano oxidativo a proteínas e lipídeos e na produção de espécies reativas, como observado por Zolkipli e colaboradores (2011), mas ainda é desconhecido o agente indutor deste processo. Considerando-se esses fatores e que o EMA é um grande candidato a agente tóxico, torna-se necessária a investigação dos mecanismos que levam à indução de EO, na tentativa de desvendar os mecanismos fisiopatológicos da doença.

## 2 **OBJETIVOS**

### 2.1 **Objetivo Geral**

Avaliar o efeito da administração aguda de EMA sobre parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral e músculo esquelético de ratos jovens.

### 2.2 **Objetivos Específicos**

- Reproduzir um modelo animal de deficiência de SCADD e EE induzido quimicamente através da administração aguda de EMA em ratos jovens;
- Avaliar os efeitos da administração aguda de EMA sobre parâmetros de estresse oxidativo (níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, conteúdo de carbonilas e sulfidrilas, concentrações de glutathione reduzida, oxidação de 2,7-diclorofluoresceína, níveis de ânions superóxido e atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase) em córtex cerebral de ratos jovens;
- Avaliar os efeitos da administração aguda de EMA sobre parâmetros de estresse oxidativo (níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, conteúdo de carbonilas e sulfidrilas, concentrações de glutathione reduzida, oxidação de 2,7-diclorofluoresceína, níveis de ânions superóxido e atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase) em músculo esquelético de ratos jovens.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 2.3 Animais

Foram utilizados 24 animais da espécie *Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar, machos de 30 dias de vida (100-120g). Os ratos foram mantidos em ciclos de claro-escuro de  $\pm 12$  horas a uma temperatura de  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ . Os animais tiveram livre acesso à água e ao alimento. A utilização dos animais seguiu um protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (protocolo nº 92/2012) e seguiu os Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório (*Principles of Laboratory Animal Care*, Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América, NIH, publicação número 85-23, revisada em 1996).

#### 2.4 Modelo animal de AE induzido quimicamente

O modelo animal de AE induzido quimicamente utilizado no presente estudo foi realizado de acordo com Ferreira et al. (2006). Os animais foram divididos em dois grupos (controle e EMA) com 12 animais em cada grupo, para que se tivesse tecido suficiente para a realização de todas as técnicas bioquímicas. Os animais receberam três administrações subcutâneas de EMA ( $6 \mu\text{mol/g}$  de peso corporal; intervalos de 90 minutos entre cada administração; grupo EMA) ou de solução salina 0,9 % (grupo controle), como demonstrado na Figura 6. Os animais não foram anestesiados para a realização das administrações, visto que a adição de outros fármacos invalidaria os experimentos, pois não conseguiríamos isolar o efeito do EMA e, sim, efeitos sinérgicos. De acordo com este modelo químico de AE, as concentrações atingidas no plasma são de aproximadamente 3 mM, enquanto que



as concentrações cerebrais atingem aproximadamente 0,5 mM (Ferreira et al., 2006).

### 3.3 *Preparo da amostra*

Após uma hora da última administração de EMA ou solução salina, os animais foram eutanasiados por decapitação com guilhotina, sem anestesia, e o córtex cerebral e o músculo sóleo isolados. A seguir, os tecidos foram homogeneizados em tampões específicos para cada técnica. O homogeneizado obtido foi levado à centrifugação a 800 x *g* por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi congelado a – 80° C e homogeneizados no dia para as diferentes análises bioquímicas.

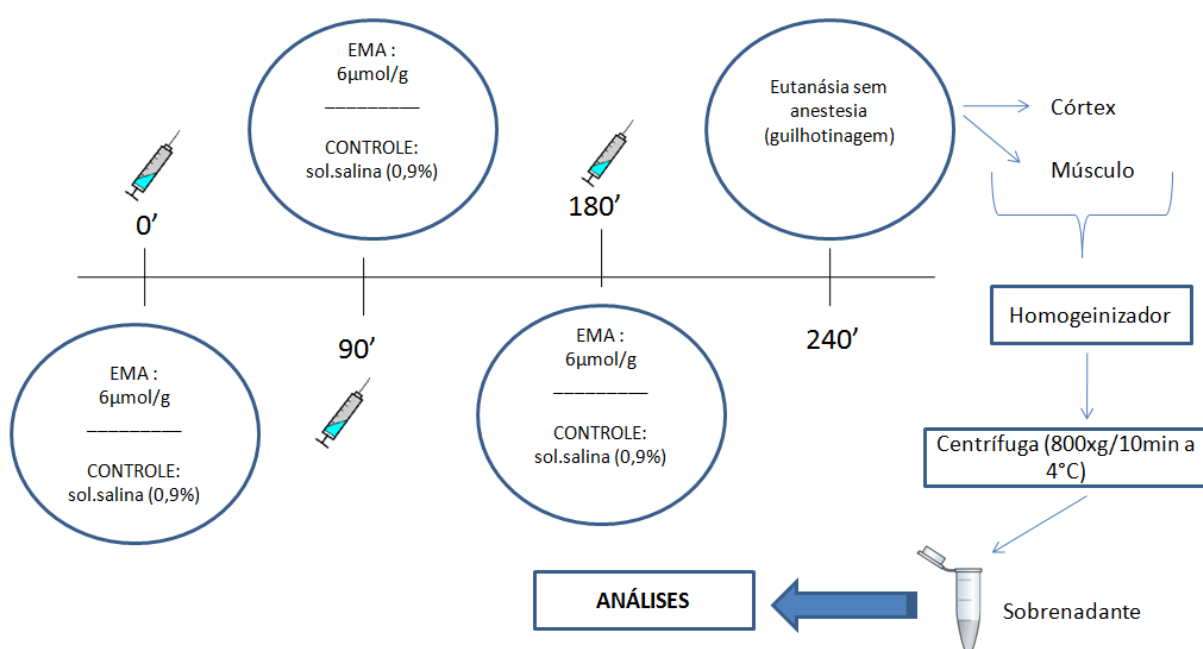


Figura 6: Esquema do modelo animal de AE (Desenvolvido por Milanez e Schuck, 2013).

## 2.5 *Análises Bioquímicas*

#### 3.4.1 *Medida dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico*

A medida de níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) foi realizada de acordo com o método de Esterbauer e Cheeseman (1990). Ácido tricloroacético (TCA) 10 % com sulfato de sódio foi adicionado ao sobrenadante na proporção 1:1 (v/v). Após centrifugação, o sobrenadante foi tratado com ácido tiobarbitúrico 0,67 % na proporção de 1:1(v/v). A mistura foi levada a um banho fervente durante 25 min e, após, resfriada em água à temperatura ambiente. A absorvância obtida através da coloração rósea resultante foi medida em espectrofotômetro a 532 nm. Concomitantemente, foi feita uma curva de calibração com 1,1,3,3– tetrametoxipropano, na qual todos os pontos foram tratados da mesma forma que as amostras. Os resultados foram expressos como nmol de TBA-RS . mg de proteína<sup>-1</sup>.

#### 3.4.2 *Medida da oxidação de 2,7-diclorofluoresceína*

A produção de espécies reativas foi determinada de acordo com o método de LeBel e colaboradores (1992), utilizando-se o diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCF-DA). Às alíquotas provenientes da incubação, adicionou-se o DCF-DA, o qual é permeável à membrana celular, e essas alíquotas foram incubadas durante 30 min a 37 °C. No meio intracelular, esterases clivam o grupamento acetato do DCF-DA, gerando a forma reduzida de 2,7-diclorofluoresceína (DCFH). As espécies reativas presentes no meio oxidam o DCFH, produzindo o produto fluorescente, a forma oxidada da 2,7-diclorofluoresceína (DCF). A fluorescência foi medida usando comprimentos de onda de 480 (excitação) e 535 nm (emissão). A curva de calibração foi realizada com DCF padrão (0-10 µM) e a concentração das espécies reativas foi expressa como pmol de DCF formado . mg de proteína<sup>-1</sup>.

#### 3.4.3 Medida da produção de ânions superóxido

A produção de ânions superóxido foi determinada em partículas submitocondriais através de um método espectrofotométrico, que se baseia na oxidação da epinefrina a um adenocromo pelos ânions superóxido a 37°C (Boveris et al., 1984). O meio foi constituído de tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4, manitol 0,23 M, sacarose 0,07 M, catalase 0,1 mM e epinefrina 1 mM. SOD purificada em concentrações finais de 0,1 a 0,3 mM foi utilizada como controle positivo para a técnica. A produção de superóxido foi expressa em  $\text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg de proteína})^{-1}$ .

#### 3.4.4 Medida de sulfidrilas totais

Este parâmetro foi realizado de acordo com o método de Aksenov e Markesbery (2001). A oxidação dos tióis livres da amostra leva à formação de pontes dissulfeto; o ácido ditionitrobenzóico (DTNB), reagente de cor, é reduzido pelos tióis não oxidados, gerando um derivado amarelo (TNB), lido espectrofotometricamente a 412 nm. Com isso, o método determina os tióis totais da amostra. Os resultados foram expressos em  $\text{nmol de TNB formado} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ .

#### 3.4.5 Medida do conteúdo de grupos carbonila

A medida de formação de carbonilas foi realizada espectrofotometricamente de acordo com Reznick e Packer (1994). Uma alíquota de sobrenadante foi tratada com uma solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH; 1:2 v/v) 10 mM preparada em HCl 2,5 N e deixada por 1 hora no escuro à temperatura ambiente. As amostras foram então precipitadas com TCA 20 % e centrifugadas durante 5 min a  $9.000 \times g$ . Após a centrifugação, o sedimento obtido foi lavado 2 vezes com uma mistura de

etanol:acetato de etila (1:1v/v) e ressuspensão em guanidina 6 M. A diferença entre as amostras tratadas com DNPH e as tratadas com HCl (branco) foi utilizada para calcular o conteúdo de carbonilas da amostra a 365 nm. Os resultados foram calculados como nmol de carbonilas . mg de proteína<sup>-1</sup>, utilizando-se o coeficiente de extinção de  $22.000 \times 10^6$  mM para hidrazonas alifáticas.

#### 3.4.6 *Determinação das concentrações de GSH*

As concentrações de GSH foram determinadas através do método descrito por Browne e Armstrong (1998). As amostras foram diluídas em 10 volumes de tampão fosfato de sódio pH 8,0 contendo EDTA 5 mM. Adicionou-se a uma alíquota dessa preparação o o-ftaldialdeído (1 mg/mL dissolvido em metanol) e a mistura foi incubada durante 15 minutos à temperatura ambiente e posteriormente lida em espectrofluorímetro a 350 nm (excitação) e 420 nm (emissão). As concentrações de GSH foram calculadas a partir de uma curva padrão de GSH (0,01 – 1 mM) como nmol de GSH . mg de proteína<sup>-1</sup>.

#### 3.4.7 *Medida das atividades das enzimas antioxidantes*

GPx: A atividade da enzima GPx foi determinada pelo método de Wendel (1981), usando hidroperóxido de tert-butila como substrato. Em cubeta de quartzo, foram adicionados tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, contendo EDTA 1 mM, azida sódica 40 mM, GSH 100 mM, glutatona redutase purificada 10 U/mL, NADPH 10 mM e amostra (0,1 – 0,3 µg de proteína). Esta mistura foi incubada a 25 °C durante 1 minuto, a fim de estabilizar o meio, e após foi adicionado hidroperóxido de *tert*-butila 10 mM para iniciar a reação. Os brancos foram preparados substituindo-se a amostra por tampão fosfato. A queda da absorvância a 340 nm foi

acompanhada e a atividade da GPx foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção do NADPH a 340 nm de  $6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . A atividade da GPx foi calculada como  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ .

CAT: Foi determinada a atividade desta enzima através do método de Aebi (1984). Ao sobrenadante foi adicionado Triton X-100 0,1 % seguido de agitação e esta mistura foi conservada em gelo durante 15 minutos. A uma alíquota de tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0 foi adicionado  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% (v/v). Após a adição da amostra, foi realizada a leitura da queda da absorvância do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em espectrofotômetro a 240 nm, à temperatura ambiente ( $22^\circ\text{C} \pm 2$ ). Para o cálculo da CAT, utilizou-se o coeficiente de extinção do  $\text{H}_2\text{O}_2$  de  $43.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Os resultados da atividade da CAT foram expressos em  $\text{nmol de H}_2\text{O}_2 \text{ consumido} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ .

SOD: A atividade da enzima SOD foi medida mediante a formação do vermelho de formazan através da reação do ânion superóxido (produzido no meio a partir de um sistema xantina-xantina oxidase) e do cloreto de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio, gerando um complexo rosa que é lido a 505 nm (Boveris et al., 1984). A inibição de formação do cromógeno foi proporcional à atividade da SOD. Os resultados da atividade da SOD foram expressos em  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ .

#### 3.4.8 Dosagem de proteínas

Foi efetuada através do método de Lowry e colaboradores (1951), usando-se a albumina sérica bovina como padrão.

### **3.5 Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada utilizando-se teste *t* de Student para amostras independentes. As análises estatísticas foram feitas pelo software *Statistical Package for the Social Science (SPSS)* versão 16.0. Foram consideradas diferenças significativas quando o valor de  $p \leq 0,05$ .

### **3.6 Biossegurança**

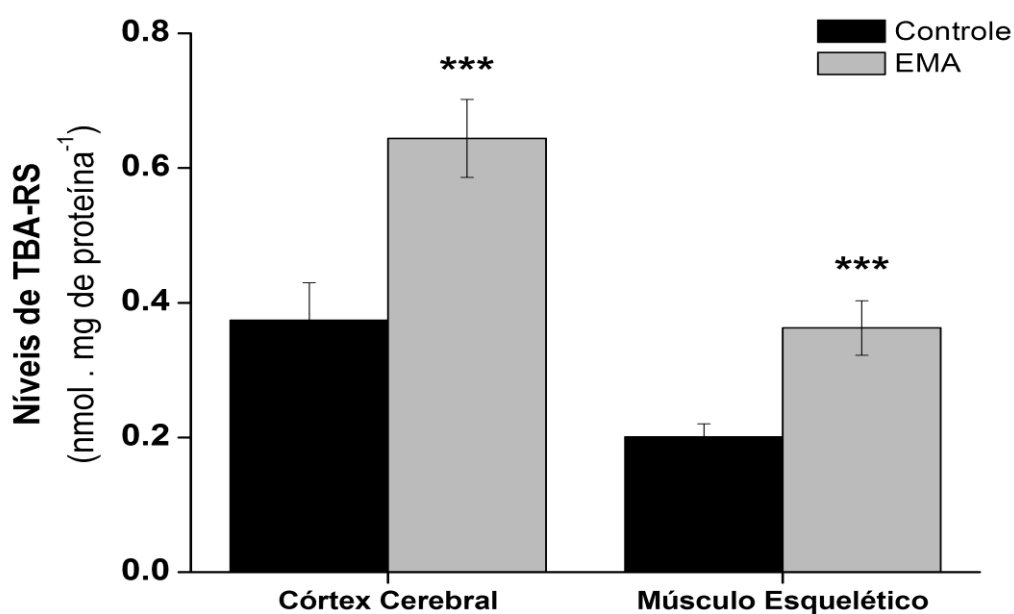
O manuseio de reagentes e os cuidados para a proteção do pesquisador seguiram as normas de biossegurança estabelecidas pela Fundação Oswaldo Cruz (<http://www.fiocruz.br/biosseguranca/bis/bismanua.htm>).

### **3.7 Destino dos animais pós-experimentação**

O descarte dos resíduos biológicos deu-se pelo acondicionamento em saco branco que foi encaminhado e armazenado em freezer nas dependências da Universidade. Posteriormente, foram coletados e transportados por uma empresa terceirizada. Os resíduos foram tratados fisicamente e encaminhados para disposição final em aterro sanitário. Todos os procedimentos estiveram de acordo com a RDC 306/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

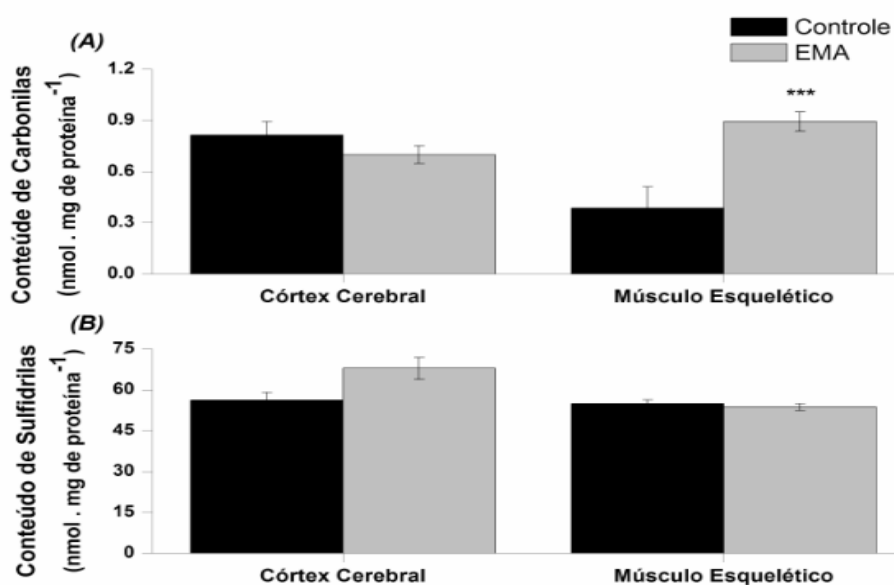
#### 4. RESULTADOS

Inicialmente, foi avaliado o efeito da administração aguda de EMA sobre os níveis de TBA-RS em músculo esquelético e córtex cerebral de ratos jovens. A Figura 7 mostra que a administração aguda de EMA aumentou significativamente as concentrações de TBA-RS em ambos tecidos ( $p < 0,001$ ), indicando que houve um aumento da peroxidação lipídica nas amostras.



**Figura 7:** Efeitos da administração aguda de ácido etilmalônico (EMA) sobre os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral e músculo esquelético de ratos jovens. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n=6$ ) e estão expressos em nmol . mg proteína<sup>-1</sup>. \*\*\* $p < 0,001$  em comparação ao grupo controle (Teste  $t$  de Student para amostras independentes).

Nosso próximo passo foi avaliar parâmetros de dano oxidativo proteico. Na Figura 8A, pode-se observar um aumento significativo do conteúdo de grupamentos carbonila em músculo esquelético de ratos que receberam administração aguda de EMA ( $p>0,001$ ), quando comparado ao grupo controle, o que não foi observado em córtex cerebral. Entretanto, o conteúdo de sulfidrilas não se apresentou diferente em nenhum dos tecidos avaliados.

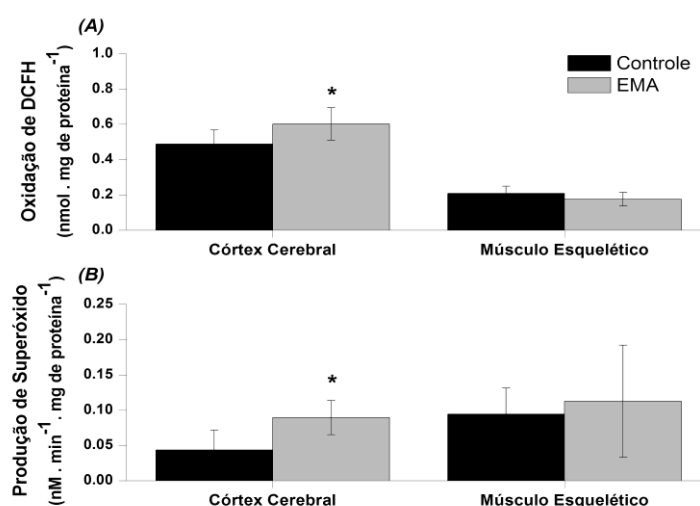


**Figura 8:** Efeitos da administração aguda de ácido etilmalônico (EMA) sobre os conteúdos de grupamentos carbonila (A) e sulfidrilas (B) em córtex cerebral e músculo esquelético de ratos jovens. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n=6$ ) e estão expressos em  $\text{nmol} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ . \*\*\* $p < 0,001$  em comparação ao grupo controle (Teste  $t$  de Student para amostras independentes).

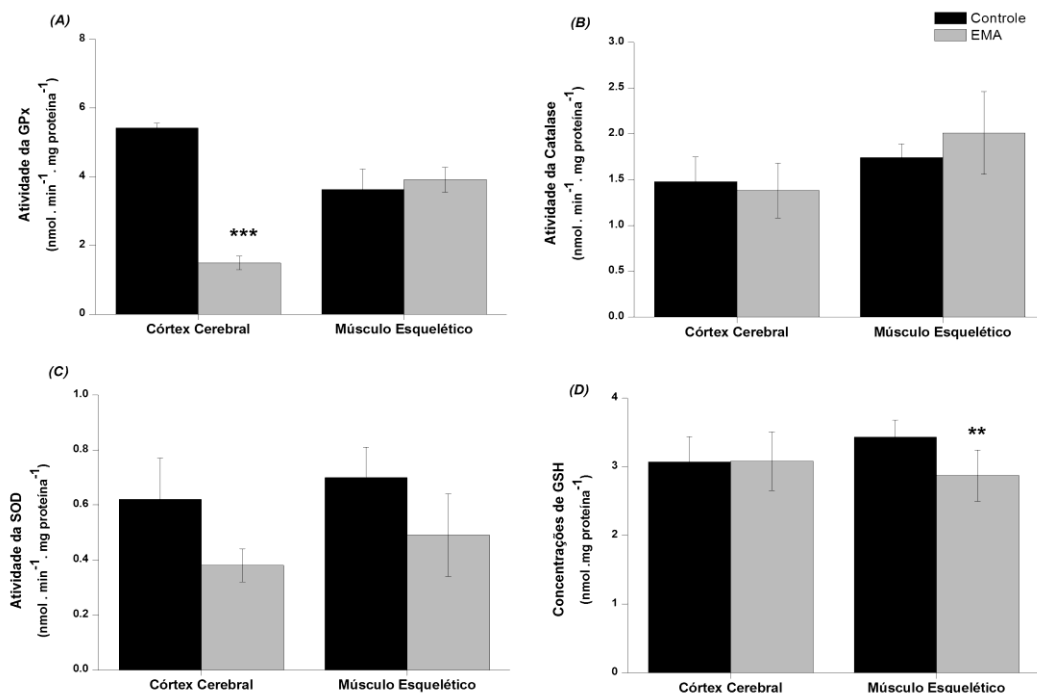
A seguir, foram avaliados os efeitos do EMA sobre a oxidação de DCFH e sobre a produção de superóxido, a fim de verificar se este ácido induz um aumento



na geração de ER. Como podemos observar na Figura 9, houve um aumento significativo na oxidação de DCFH (Figura 9A) ( $p < 0,05$ ), bem como na produção de ânions superóxido (Figura 9B) ( $p < 0,05$ ) em córtex cerebral, sem apresentar nenhuma alteração em músculo esquelético. Tais resultados sugerem que a administração de EMA induz um aumento na formação de ERO em córtex cerebral de ratos jovens.



**Figura 9:** Efeitos da administração aguda de ácido etilmalônico (EMA) sobre a oxidação de 2',7,-diclorofluoresceína reduzida (A) e produção de ânion superóxido (B) em córtex cerebral e músculo esquelético de ratos jovens. Os valores representam a média (n=6)  $\pm$  erro padrão da média e estão expressos em nmol . mg proteína<sup>-1</sup>(DCFH) e nM .min<sup>-1</sup>. mg proteína<sup>-1</sup> (superóxido). \* $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle (Teste *t* de Student para amostras independentes).



**Figura 10:** Efeitos da administração aguda de ácido etilmalônico (EMA) sobre as atividades das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase (GPx) (A), catalase (B) e superóxido dismutase (C) e sobre as concentrações de glutathione reduzida (GSH) (D) em córtex cerebral e músculo esquelético de ratos jovens. Os valores representam a média (n=6)  $\pm$  erro padrão da média e estão expressos em nmol . min<sup>-1</sup> . mg proteína<sup>-1</sup> (atividades enzimáticas) e nmol . mg proteína<sup>-1</sup> (GSH). \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 em comparação ao grupo controle (Teste t de Student para amostras independentes).

Finalmente, foi avaliado o efeito do EMA sobre as atividades das enzimas antioxidantes GPx, CAT e SOD e sobre as concentrações de GSH, o principal antioxidante não enzimático dos tecidos. Pode-se observar que a administração aguda de EMA ocasionou uma inibição da atividade da enzima GPx (Figure 10A) (p < 0,001) em córtex cerebral e uma diminuição das concentrações de GSH no músculo esquelético (Figure 10D) (p > 0,01). Entretanto, as atividades das enzimas

CAT (Figura 10B) e SOD (Figura 10C) não foram alteradas nos animais que receberam EMA, quando comparados ao grupo controle.

## 5. DISCUSSÃO

EE é uma doença metabólica devastadora, levando os pacientes acometidos por esta doença a apresentarem sintomas neuromusculares crônicos e progressivos e podendo levar estes pacientes à morte ainda na primeira década de vida. Por outro lado, apenas uma parcela dos pacientes acometidos por SCADD sofre crises metabólicas agudas, durante as quais manifestam sinais e sintomas neuromusculares. A SCADD também pode ser fatal, mas apenas durante tais crises (Tiranti et al., 2009).

Na EE, o gene afetado (ETHE 1) codifica a enzima sulfurtransferase, que participa da via do metabolismo dos sulfetos, levando ao acúmulo de sulfeto e tiosulfato. Este defeito resulta no acúmulo de tiosulfato e de sulfeto, acompanhados de um acúmulo persistente de EMA (Tiranti et al., 2009). Evidências obtidas de artigos da literatura internacional com camundongos nocaute para este gene, bem como com experimentos *in vitro*, indicam que o sulfeto é um potente inibidor do complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial (citocromo c oxidase) no músculo e cérebro dos animais. Além disso, esta substância foi também considerada responsável pelos sintomas vasculares e intestinais na EE (Tiranti et al., 2009). Diferentemente da EE, na SCADD não há acúmulo de tiosulfato ou sulfeto, e a AE é transitória, ao invés de crônica, levando a uma sintomatologia de aparecimento súbito (agudo) (Roe e Ding, 2001). Pacientes afetados pela SCADD apresentam sintomas somente durante estes períodos de crises agudas, que são secundárias a períodos de alta demanda energética, como jejum prolongado, infecções virais e exercícios extenuantes, quando ocorre um aumento da demanda da oxidação de ácidos graxos como fonte de energia. Como na SCADD não é possível converter os

acil-CoA graxos de cadeia curta (como o butiril-CoA) a butirato, os ácidos graxos de cadeia curta são convertidos e acumulados como EMA (Roe e Ding, 2001).

Considerando que os sintomas neuromusculares e o acúmulo de EMA são achados frequentemente observados tanto na EE, quanto na SCADD, podemos especular que o EMA apresenta toxicidade em preparações cerebrais e musculares (músculo esquelético). Neste sentido, quando incubado com homogeneizados de cérebro de ratos, o EMA inibe a atividade da enzima CK, provavelmente devido à ação de espécies reativas, uma vez que esta inibição é prevenida pela coincubação com antioxidantes (Schuck et al., 2002; Leipnitz et al., 2003). O EMA também induz a oxidação de lipídeos e proteínas em homogeneizados de córtex cerebral de ratos (Schuck et al., 2010). Em biópsias humanas de músculo esquelético, houve uma redução significativa na atividade da enzima CK e dos complexos I-III, II e II-III da cadeia respiratória após incubação com EMA (Barschak et al., 2006). O desenvolvimento de um modelo animal de EA permitiu a caracterização da toxicidade *in vivo* promovida pelo EMA (Ferreira et al., 2006). Os principais efeitos deletérios atribuídos ao EMA incluem deficiências de memória e aprendizado, além de redução da atividade da CK e aumento da LPO em hipocampus de animais que receberam a administração deste ácido orgânico (Schuck et al., 2009).

Recentemente, foi demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa que a incubação *in vitro* do EMA com homogeneizados de córtex cerebral não alterou a atividade da enzima NAK, outra enzima que apresenta alta sensibilidade a espécies reativas de oxigênio, mas a administração deste composto resultou em um aumento significativo da atividade enzimática, com concomitante diminuição na expressão de ARNm das subunidades desta enzima (Schuck et al., 2013).

Dessa forma, no presente trabalho investigamos em maiores detalhes os efeitos *in vivo* do EMA na indução do estresse oxidativo em músculo esquelético e córtex cerebral de ratos administrados com este ácido graxo de cadeia curta. Observamos que os animais que receberam a administração de EMA apresentaram um marcado aumento nos níveis de TBA-RS em músculo esquelético e córtex cerebral, indicando que o EMA induz LPO, um efeito que é provavelmente mediado pela geração de ERO. Além disso, um aumento no dano às proteínas foi verificado no músculo dos animais que receberam EMA, como identificado pelo aumento nos níveis de grupamentos carbonila neste tecido, contrastando com os resultados observados em córtex cerebral, onde nenhuma diferença significativa entre os grupos foi observada. O conteúdo de sulfidrilas, outro importante marcador de dano oxidativo a proteínas, não foi afetado pelo tratamento com EMA.

Além disso, observamos que a oxidação de DCFH, um marcador não seletivo da produção de ERO, e a geração de ânions superóxido encontraram-se aumentadas no córtex cerebral dos animais que receberam EMA. O efeito da administração aguda de EMA sobre as defesas antioxidantes em córtex cerebral e músculo esquelético de ratos jovens foi também investigado, através da avaliação das atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx. Somente a atividade da GPx em córtex cerebral foi inibida pela administração do EMA, sem apresentar efeito sobre esta atividade enzimática em músculo esquelético. Além disso, não foram observadas alterações na atividade da CAT ou da SOD nos tecidos estudados. Finalmente, os níveis de GSH, um composto antioxidante não enzimático que elimina peróxido e radicais peroxila, encontraram-se diminuídos no músculo esquelético dos animais que receberam EMA.

Tomados em seu conjunto, os resultados apresentados no presente estudo estão de acordo com achados previamente descritos na literatura, indicando que o EMA apresenta toxicidade sobre a cadeia respiratória mitocondrial e enzimas que apresentam grupamentos tióis críticos no sítio catalítico, que são altamente susceptíveis ao dano oxidativo, como a CK e a NAK. Na mesma linha dos resultados apresentados aqui, duas publicações recentes mostram que fibroblastos de pacientes com SCADD são mais suscetíveis à morte celular por apoptose quando incubados *in vitro* na presença de uma substância pró-oxidante, do que fibroblastos de pacientes acometidos por outros defeitos de beta-oxidação ou de indivíduos normais (Pedersen et al., 2010; Zolkipli et al., 2011). Uma explicação para este achado inclui o desequilíbrio redox das células provocado pelo acúmulo de EMA nos pacientes acometidos pela SCADD, em que as defesas antioxidantes das células epiteliais das biópsias estão diminuídas, tornando estas células mais propensas a sofrer apoptose após a incubação com substâncias pró-oxidantes (Zolkipli et al., 2011).

Sabe-se que uma inibição dos complexos da cadeia transportadora de elétrons provoca um aumento na produção de ERO e que estas substâncias podem atacar lipídeos e proteínas, podendo alterar diversas atividades enzimáticas nas células do sistema nervoso central. Este é um mecanismo bastante descrito na literatura e está envolvido na fisiopatologia de diversas doenças neurodegenerativas (Bondy e Lebel, 1993; Aksenov e Markesbery, 2001) e erros inatos do metabolismo (Wyse et al., 2001; Delwing et al., 2003; Vargas et al., 2011; Campos e Monaga, 2012).

Com base nos nossos achados, podemos supor que a drástica variação na apresentação clínica dos pacientes acometidos pela SCADD possa ser secundária a

diferenças nas concentrações de EMA e sensibilidade tecido-específicas a este ácido graxo, bem como em sua depuração, que são variáveis individuais. Isto pode dar suporte à hipótese de acúmulo de metabólitos tóxicos, em que ao menos alguns dos sintomas neuromusculares observados na SCADD podem ser atribuídos ao acúmulo de EMA no cérebro e músculo esquelético destes pacientes.

Com relação à EE, apesar dos importantes achados demonstrando o acúmulo de sulfeto como a principal toxina envolvida na fisiopatologia desta doença (Tiranti et al., 2009), existe uma grande variedade de achados apontando para o EMA como um metabólito tóxico a ser considerado, incluindo os achados descritos no presente trabalho. A toxicidade do EMA pode também explicar o porquê dos pacientes com EE, em que ocorre o acúmulo crônico de sulfeto e EMA, apresentarem uma sintomatologia mais agressiva do que a SCADD. Entretanto, uma interação entre estes compostos ainda deve ser investigada. Finalmente, nossos achados demonstrando a capacidade do EMA de induzir estresse oxidativo *in vivo* podem ser importantes para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a EE e a SCADD.

## CONCLUSÃO

No presente trabalho, apresentamos evidências experimentais de que o EMA induz estresse oxidativo em córtex cerebral e músculo esquelético de ratos jovens. Tal conclusão pode ser obtida a partir do fato de que a administração aguda deste ácido orgânico aumenta o dano oxidativo a proteínas e lipídeos, bem como a produção de ERO, além de alterar as defesas antioxidantes dos tecidos. Tais achados podem sugerir que o uso de antioxidantes pode ser levado em consideração para o tratamento de pacientes de SCADD e EE.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 121- 6.

Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2001; 302:141- 5.

Amendt BA; Greene C, Sweetman L, Cloherty J, Shih V, Moon A, Teel L, Rhead WJ. Short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: clinical and biochemical studies in two patients. *J Clin Invest.* 1987; 79: 1303- 9.

BarschK AG, Ferreira GC, André KR, Schuck PF, Viegas CM, Tonin A, Dutra-Filho CS, Wyse ATS, Wannmacher CMD; Vargas CR, Wajner M. Inhibition of the electron transport chain and creatine kinase activity by ethylmalonic acid in human skeletal muscle. *Metab Brain Dis.* 2006; 21:11-9.

Bhala A, Willi SM, Rinaldo P, Bennett MJ, Schimidt-Sommerfeld E, Hale DE. Clinical and biochemical characterization of short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *J Pediatr.* 1995; 126: 910- 5.

Birkebaek NH, Simonsen J, Gregersen N. Hypoglycemia and elevated urine ethylmalonic acid in a child homozygous for the short-chain acyl-CoA dehydrogenase 625>A gene variation. *Acta Pediatr.* 2002; 91: 480 - 6.

Bondy SC, Lebel CP. The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system. *Free Rad Biol Med*. 1993; 14:633-42.

Boveris A. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymol*. 1984; 105: 429-35.

Browne RW, Armstrong D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol*. 1998; 108: 347-52.

Burlina AB, Dionisi-Vici C, Bennett MJ, Gibson KM, Servidei S, Bertini E, Hale DE, Schimdt-Sommerfeld E, Sabeta G, Zacchelo F. A new syndrome with ethylmalonic aciduria and normal fatty acid oxidation in fibroblasts, *J. Pediatr*. 1994; 124 (1): 79-86.

Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Rad. Biol. Med*. 2000; 29:222-30.

Campos D, Monaga M. Mucopolysaccharidosis type 1: current knowledge on its pathophysiology mechanisms. *Metab. Brain Dis*. 2012; 27(2): 121-29.

Cheesenan KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*. 1993; 49 (3).

Corydon MJ, Gregersen N, Lehnert W, Ribes A, Rinaldo P, Kmoch S, Christensen E, Kristensen TJ, Andresen BS, Bross P, Winter V, Martinez G, Neve S, Jensen TG,

Bolund L, Kovraa S. Ethylmalonic aciduria is associate with an amino acid variant of short-chain acyl-CoA dehydrogenase. *Pediatr Res.* 1996; 39: 1059-66,

Dawson DB, Waber L, Hale DE, Bennett MJ. Transient organic aciduria and persistent lactic acidemia in a patient with short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *J Pediatr.* 1995; 126: 69-71.

Delwing D, Bavaresco CS, Wanmacher CM, Wajner M, Dutra-Filho CS, Wyse AT. Proline induces oxidative stress in cerebral cortex of rats, *Int J Dev Neurosci.* 2003; 21 (2): 105-10.

Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 407-21.

Garcia-Silva MT, Campos Y, Ribes A, Briones P, Cabello A, Santos BJ, Arenas J, Garavaglia B. Encephalopathy, petechiae, and acrocyanosis with ethylmalonic aciduria associate with muscle cytochrome c deficiency. *J Pediatr.* 1994; 125:843.

Garcia-Silva MT, Ribes A, Campos Y, Garavaglia B, Arenas J. Syndrome of encephalopathy, petechiae and ethylmalonic aciduria. *Pediatr Neurol.* 1997; 17:165-70.

Gregersen N, Winter VS, Corydon MJ, Corydon TJ, Rinaldo P, Ribes A, Martinez G, Bennett MJ, Vianey-Saban C, Bhala A, Hale DE, Lehnert W, Kmoch S, Roing

M, Riudor E, Eiberg H, Andersen BS, Bross P, Bolund LA, Kovraa s. Identification of four new mutations in the short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) gene in two patients: one of the variant alleles, 511>T, is present at an unexpectedly high frequency in the general population, as was the case for 625G>A, together conferring susceptibility to ethylmalonic aciduria. *Hum Mol Genet*; 7(4): 619-27, 1998.

Gregersen N, Andersen BS, Pedersen CB, Olsen RK, Corydon MJ, Bross P. Mitochondrial fatty acid oxidation defects-remaining challenges. *J Inher Metab Dis*. 2008; 31: 643-57.

Halliwell B. Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochem Soc Trans*. 1996; 24 (4): 1023-27.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Detections of free radicals and others reactive species: trapping and finger printing. In: Halliwell B, Gutteridge JMC, Eds. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press; 2007. p. 351-25.

Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett*. 2000; 486 (1):10-13.

Halliwell B. Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem. *FEBS Lett*. 2003; 540:3-6.

Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* 2007; 35 (5): 1147-50.

Heales SL, Bolanos JP, Brand MP, Clarck JB, Land JM. Mitochondrial damage: an important feature in a number of inborn errors of metabolism. *J Inher Metab Dis.* 1996; 19: 140-42.

Hoppel C, Dimauro B, Tandler B. Riboflavin and rat hepatic structure and function. *J Biol Chem.* 1979; 254: 4164-70.

Illsinger S, Das AM. Impact of selected inborn errors of metabolism on prenatal and neonatal development. *IUBMB Life.* 2010; 62: 403-13.

Jethva R; Bennett MJ, Vockley J. Short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase Deficiency. *Mol Genet Metab.* 2008; 95: 195-00.

Kienzle-Hagen ME, Pederzoli CD, Sgaravatti AM, Bridi R, Wajner M, Wanmacher CM, Wyse AT, Dutra-Filho CS. Experimental hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1586: 344-52.

Kølvraa S, Gregersen N, Christensen E, Hobolth N. In vitro fibroblast studies in a patient with C6-C10-dicarboxylic aciduria: evidence for a defect in general acyl-CoA dehydrogenase. *Clin Chim Acta.* 1982; 126: 53-67.

- Lebel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol*. 1992; 5: 227-31.
- Leipnitz G, Schuck PF, Ribeiro CA, Dalcin KB, Assis DR, Barschak AG, Pulrolnik V, Wannmacher CM, Wyse AT, Wajner M. Ethylmalonic acid inhibits mitochondrial creatine kinase activity from cerebral cortex of young rats in vitro. *Neurochem Res*. 2003; 28: 771-7.
- Lowry OH, RosebroughvNJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193: 265-75.
- Merineo B, Perez-Cerda C, Ruiz SP, Ferrer I, García MJ, Martínez Pardo M, Belanger-Quintana A, de la Mota JL, Martin-Hernández E, Vianey-Saban C, Bischoff C, Gregersen N, Ugarte M. Persistent increase of plasma butyryl/isobutyrylcarnitina concentrations as marker of SCAD defect and ethylmalonic encephalopathy. *J Inherit Metab Dis*. 2006; 29: 685.
- Mikati MA; Chaaban HR; Karam PE; Krishnamoorthy KS. Brain malformation and infantile spasms in a SCAD deficiency patient. *Pediatr Neurol*. 2007; 36:48-50.
- Mineri R, Rimoldi M, Burlina AB, Koskull S, Perletti C, Heese B, von Döbeln U, Mereghetti P, Di Meo I, Invernizzi F, Zeviani M, Uziel G, Tiranti V. Identification of new mutation in the ETHE1 gene a cohort of 14 patients presenting with ethylmalonic encephalopathy. *J Met Gen*. 2008; 45: 473-8.

Nagao M, Tanaka K. FAD-regulation of transcription and post-transcription processing and post-processing stability of various mitochondrial acyl-CoA dehydrogenase and electron transfer flavoprotein and the site of holoenzyme formation. *J Biol Chem.* 1992; 267: 17925-32.

Nelson DL, Cox MML: *Princípios de Bioquímica*. 5ed. São Paulo: Sarvier, 2011.

Nohl H, Jordan W. The mitochondrial site of superoxide formation. *Biochem Res Commun.* 1986; 138 (2): 533-9.

Ozand PT, Rashed M, Milington DS, Hazzaa S, Rahbeeni Z, Alodaib A, Youssef N, Mazrou A, Gascon GG, Brismar J. Ethylmalonic aciduria: An organic academia with involvement and vasculopathy. *Brain Dev.* 16:12-22, 1994.

Pedersen CB, Bross P, Winter VS, Corydon TJ, Bolund L, Bartlett K, Vockley J, Gregersen N. Misfolding, degradation and aggregation of variant proteins; the molecular pathogenesis of short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) deficiency. *J Biol Chem.* 2003; 278: 47449-58.

Pedersen CB, Kovrra S, Kovrbroen V, Kjeldsen M, Ensenauer R, Matern D, Rinaldo P, Vianey-Saban C, Ribes A, Lehnert W, Christensen E; Corydon TJ, Andersen BS, Vang S, Bolund L, Vockley J, Bross P, Gregersen N. The ACAD's gene variation spectrum in 114 patients with short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency is dominated by missense variations leading to protein misfolding at the cellular level. *Hum Genet.* 2008; 124: 43-56.

- Pigeon N, Campeau PM, Cyr D, Lemieux B, Clarke JT. Clinical heterogeneity in ethylmalonic encephalopathy. *J Child Neurol.* 2009; 24: 991-6.
- Reznick AZ; Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 1994; 233: 357-63.
- Rimbach G, Höhler D, Fischer A, Roy S, Virgili F, Pallauf J, Packer L. Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Arch Tierernähr.* 1999; 52(3): 203-22.
- Rinaldo P. Fatty acid transport and mitochondrial oxidation disorders. *Semin Liver Dis.* 2001; 21: 489-00.
- Roe CR, Ding J. Mitochondrial fatty acids oxidation disorders. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. *The online metabolic and molecular bases of inherited diseases.* New York: McGraw-Hill; 2001.
- Schapira AH. Primary and secondary defects of the mitochondrial respiratory chain. *J Inherit Metab Dis.* 2002; 25: 207-14.
- Schuck PF, Busanello EN, Moura AP, Tonin AM, Grings M, Ritter L, Vargas CR, Ferreira GC, Wajner M. Promotion of lipid and protein oxidative damage in rat brain by ethylmalonic acid. *Neurochem Res.* 2010; 35: 298-05.



Schuck PF, De Assis DR, Viegas CM, Brandão Pereira TC, Machado JL, Furlanetto CB, Bogo MR, Streck EL, Ferreira GC. Ethylmalonic acid modulates Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity and mRNA levels in rat cerebral cortex. *Synapse*. 2013; 67: 111-7.

Schuck PF, Ferreira Gda C, Viegas CM, Tonin AM, Busanello EN, Pettenuzzo LF, Netto CA, Wajner M. Chronic early postnatal administration of ethylmalonic acid to rats causes behavioral deficit. *Behav Brain Res*. 2009; 197: 364-70.

Schuck PF, Leipnitz G; Ribeiro CA; Dalcin KB; Assis DR; Barschak AG; Pulrolnik V; Wannmacher CM; Wyse AT; Wajner M. Inhibition of creatine kinase activity in vitro by ethylmalonic acid in cerebral cortex of young rats. *Neurochem Res*. 2002; 27: 1633-39.

Smith CM; Marks AD; Lieberman MA. Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach. 2ed. Batimore: Lippicott Williams e Wilk ins. 2005.

Tavazzi B, Di Pierro D, Amorini AM, Fazzina G, Tuttobene M, Giardina B, Lazzarino G. Energy metabolism and lipid peroxidation of human erythrocytes as a function of increased oxidative stress. *Eu J Biochem*. 2000; 267: 684-89,

Tein I, Haslam RH, Rhead WJ, Bennett MJ, Becker LE, Vockley J. Short-chain acyl-coA dehydrogenase deficiency: a cause of ophthalmoplegia and multicore myopathy. *Neurology*. 1999; 52: 366-72.

Tein I, Elpeleg O, Ben-Zeev B, Korman SH, Lossos A, Lev D, Lerman-Sagie T, Leshinsky-Silver E, Vockley J, Berry GT, Lamhonwah AM, Metern D, Roe CR, Gregersen N. Short-chain acyl-CoA Dehydrogenase gene mutation (c.319C>T) presents with clinical heterogeneity and candidate founder mutation in individuals of Ashkenazi Jewish origin; *Mol Genet Metab.* 93(2):179-89, 2008.

Tiranti V, D'Adamo P, Briem E et al: Ethylmalonic encephalopathy is caused by mutations in ETHE1, a gene encoding a mitochondrial matrix protein. *Am J Hum Genet* 74: 239-52, 2004.

Tiranti V, Briem E, Lamantea E, et al: ETHE1 mutations are specific to ethylmalonic encephalopathy. *J Med. Genet* 43:340-6, 2006.

Tiranti V, Viscomi C, Hildebrandt T, Di Meo I, Mineri R, Tiveron C, Levitt MD, Prella A, Fagiolarini G, Rimoldi M, Zeviani M. Loss of ETHE1, a mitochondrial dioxxygenase, causes fatal sulfide toxicity in ethylmalonic encephalopathy. *Nat Med.* 2009; 200-5.

van Maldegem BT, Duran M, Wanders RJA, Niezen-Koning KE, Hogeveen M, IJlst L, Waterham HR, Wijburg FA. Clinical, biochemical and genetic heterogeneity in short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *The Journal of the American Medical Association.* 2006; 296: 943-52.

van Maldegem BT, Wanders RJA, Wijburg FA. Clinical aspects of short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inher Metab Dis.* 2010; 33: 507-11.

Vargas CR, Wajner M, Sitta A. Oxidative stress in phenylketonuric patients, *Mol Genet Metab*. 2011; 104 Suppl: 97-9.

Waisbrein SE; Levy HL; Noble M; Matern D; Gregersen N; Pasley K; Marsden D. Short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) deficiency: an examination of the medical and neuro developed mental characteristics of 14 cases indentified though newborn screening or clinical symptoms. *Mol Genet Metab*. 2008; 95: 39-45.

Wajner M; Latini A; Wyse ATS; Dutra-Filho CS. The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidemias: Insighths from animal studies. *J Inherit Metabol*. 2004; 27:427-48.

Walsh DJ, Sills ES, Lambert DM, Gregersen N, Malone FD, Walsh APH. Novel ETHE1 mutation in a carrier couple having prior offspring affected with ethylmalonic encephalopathy: genetic analyses, clinical management and reproductive out come. *Mol Med*. 2010; 3: 223-6.

Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 1981; 77: 325-32.

Wyse AT; Bavaresco CS; Hagem ME; Delwing D; Wanmacher CM; Dutra-Filho CS; Wajner M. In vitro stimulation of oxidative stress in cerebral cortex by the guanidine compounds accumulating hyperargininemia. *Bran Res*. 2001; 27(1-2): 50-7.

Zolkipli Z; Pedersen CB; Lamhonwah AM; Gregersen N; Tein I. Vulnerability to oxidative stress in vitro in pathophysiology of mitochondrial short-chain acyl-coA dehydrogenase deficiency: response to antioxidants. PLoS One. 2011; 6(4): 17534.

## **7 ANEXOS**